

转移拟南芥 *CBF1* 基因引起水稻植株脯氨酸含量提高

金建凤 高强 陈勇 王君晖*

(浙江大学生命科学院, 杭州 310012)

摘要 利用农杆菌介导的转基因技术, 成功地将拟南芥抗冻转录激活因子基因 *CBF1* 转入粳稻中花 11 中, 并获得了 T1 代转基因植株。*CBF1* 基因及筛选基因 *HPT*(潮霉素抗性基因)均在 T1 代中检测到, 呈现单位点的孟德尔式遗传。常温和低温处理之后, T1 代植株体内的脯氨酸含量均比野生型明显提高, 同时, 耐低温表型也在 T1-1 株系中出现。

关键词 *CBF1*; 水稻; 低温; 脯氨酸

关于植物在逆境条件下(旱、盐碱、热、冷、冻)体内游离脯氨酸的积累已经有诸多报道^[1~4]。脯氨酸亲水性极强, 能稳定原生质胶体及组织内的代谢过程, 因而能降低冰点, 并有防止细胞脱水的作用。在低温条件下, 植物组织中脯氨酸含量的增加, 可以提高植物的抗寒性。

水稻作为世界上最重要的粮食作物之一, 其遗传育种一直受到科学工作者的重视。自从 1988 年首次获得水稻转基因植株以来, 水稻转基因技术得到了很大的重视和发展, 尤其是利用农杆菌介导的转化技术得到了空前的发展^[5~7]。

拟南芥抗冻转录激活因子基因 *CBF* 家族在近几年被深入研究, 很多研究证明, 它能明显地提高植物的脯氨酸含量和耐低温能力^[8~10]。本试验利用农杆菌介导的转基因方法, 将拟南芥抗冻转录激活因子基因 *CBF1* 转入粳稻中花 11 中, 研究它的转移对水稻脯氨酸含量的影响及植株对低温耐受能力的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料

粳稻中花 11 号由中国水稻研究所提供。

1.2 质粒构建

pCAMBIA1301-*CBF1* 由将带有 *CaMV35S* 启动子及 *NOS* 终止子的 *CBF1* 基因片段插入 pCAMBIA1301.1 构建而成。该质粒上含有潮霉素抗性筛选基因 (*HPT*) 和葡糖苷酸酶基因 (*GUS*) (图 1)。

1.3 转基因植株的获得

用中花 11 号成熟胚诱导的愈伤组织为转化材料, 用农杆菌浸染法转化, 感菌时间为 30 min,

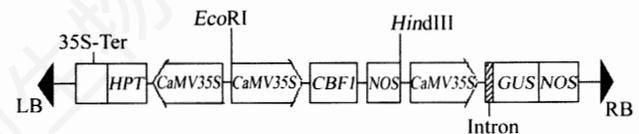


图 1 pCAMBIA1301-*CBF1* 的构建示意图

共培养时间为 3 天, 具体操作见文献[6]。转化后的愈伤组织经潮霉素(Hgm)40 mg/L、50 mg/L 先后各筛选 15 天, 将新生的抗性愈伤转入分化培养基中, 分化出苗(T0 代转基因植株)后转入生根培养基, 挑选根部和茎叶分化得较完好的苗(一共 9 株), 移栽到水培养液中, 炼苗 3 天, 然后移栽到温室土中培养至结实, 单株收取 T1 代种子, 分别标号为 T1-1 至 T1-9。

1.4 T1 代转基因植株的外源基因检测

1.4.1 潮霉素抗性检测 将 T1-1 种子表面灭菌之后在 MS+20 mg/L Hgm 上面萌发, 23 °C 暗培养至萌芽后, 转移至 28 °C, 12 h 光照温室培养, 10 天后统计潮霉素抗性分离比。

1.4.2 GUS 活性检测 将 T1-2 种子表面灭菌之后在 MS 上面萌发, 23 °C 暗培养至萌芽后, 转移至 28 °C, 12 h 光照温室培养, 10 天后剪取嫩叶小片放入到适量的 X-Gluc 染液中, 37 °C 保温过夜, 取出, 70% 酒精脱叶绿素 24 h, 解剖镜下面观察。

1.4.3 Southern 杂交检测 将基因组 DNA 用 *HindIII* 酶切, 按照 Roche 公司 DIG High Prime DNA

收稿日期: 2004-05-20 接受日期: 2004-08-31

国家自然科学基金(No.30400036)和浙江省自然科学基金(No.399505)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-88273325; Fax: 0571-88051629; E-mail: junhuiwang@zju.edu.cn

Labeling and Detection Starter Kit II 操作, 检查 *CBF1* 在水稻基因组中的拷贝数。

1.4.4 *CBF1* 基因的 PCR 检测 将 T1-1 抗潮霉素及 T1-2 *GUS* 着色的苗提取基因组 DNA, 用 *CBF1* 特异性引物进行基因组 PCR 扩增。

1.5 T1 代苗的脯氨酸测定

T1-1 和 T1-2 的 15 天和 45 天苗及同龄的野生型中花 11(即由中花 11 种子萌芽后生长的植株)移至 3~4 °C 光照培养箱, 12 h 光照, 进行 2 天低温处理。参照 Troll 等^[11]方法测定叶片中的脯氨酸含量, 重复 3 次。

1.6 T1 代苗低温处理后表型观察

T1 代 15 天苗及同龄的野生型中花 11 移至 3~4 °C 光照培养箱, 12 h 光照, 进行 2 天低温处理。观察低温处理后表型。

2 结果和讨论

2.1 *HPT*(潮霉素抗性)的统计

T1-1 被试种子数为 45 粒, 全部萌发, 且出现了性状分离。以野生型在潮霉素上面的表型为对照, 统计为: 抗潮霉素的为 33 粒, 野生型表型的为 12 粒, 表 1 表明 T1-1 株系中潮霉素抗性出现 3:1 的分离, 表明潮霉素抗性基因(*HPT*)的单个遗传位点的孟德尔式遗传。

2.2 *GUS* 活性检测

T1-2 被试种子数为 35 粒, 2 粒未萌。统计结果如表 1。*GUS* 活性染色结果证实了转基因植株后代 *GUS* 基因的分离。而且也属于单个遗传位点的孟德尔式遗传。

T1-1 和 T1-2 两个株系为单位点插入的结论还被 Southern 杂交验证(图 2)。

2.3 *CBF1* 基因的 PCR 扩增

用来自 *CBF1* 编码序列的引物进行 PCR 时, 被试的 4 株植株均出现于质粒阳性对照相同大小的扩增 DNA 片段。而对照野生型植株上则没有对应大小的条带。说明 *CBF1* 基因已成功整合到植株基因组内, 且可以稳定遗传给后代(图 3)。

2.4 脯氨酸含量测定结果

在低温处理中, 脯氨酸含量增加在很多植物中都被证实^[1-4]。在本试验中, 我们测定了转基因植株和野生型植株, 在 15 天和 45 天苗龄时, 经 2 天低温处理前后的脯氨酸含量。由图 4 可知, 在没有经过低温处理前, T1 的 15 天植株中的脯氨酸含量

表 1 *HPT* 和 *GUS* 在 T1 代中的遗传

T1 代苗	发芽的 T1 代苗数	抗性/着色数	非抗性/非着色数	χ^2
T1-1- <i>HPT</i>	45	33	12	0.007
T1-2- <i>GUS</i>	33	23	10	0.253

种子消毒后在对应的含潮霉素及不含潮霉素培养基上面萌发, 10 天后统计分离情况。 χ^2 检测表明分离比为 3:1。

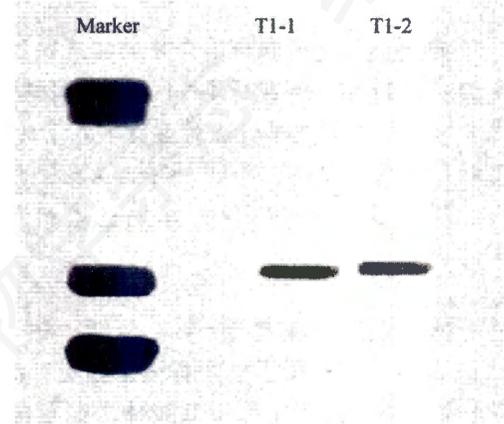


图 2 T1-1 和 T1-2 的 Southern 分析

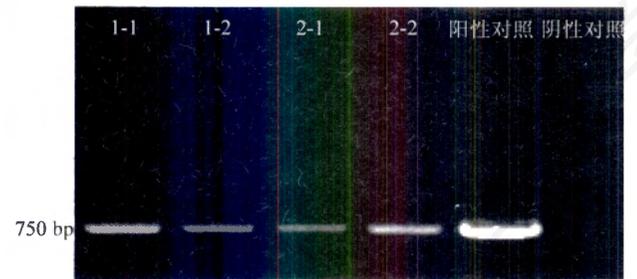


图 3 从转化植株 T1 代中 PCR 扩增的 *CBF1* 的 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

每一泳道代表一个植株。其中 1-1、1-2 均为 T1-1; 2-1、2-2 均为 T1-2; pCAMBIA1301-*CBF1* 质粒为阳性对照; 野生型中花 11 号为阴性对照。扩增出的 *CBF1* 大小为 750 bp。

约是同龄野生型的含量的 1.5 倍; 而 T1 的 45 天植株脯氨酸含量则是同龄野生型含量的 3 倍多。在经过低温处理后, T1 代植株中的脯氨酸含量显著增加, 是相同处理的同龄野生型含量的 1.3 倍(15 天苗)和 3 倍(45 天苗)。T1-2 株系的脯氨酸含量变化规律类似于 T1-1。

由此可见, 不管是否进行低温诱导, 转基因植株的脯氨酸含量均要比野生型高(图 4), 说明在水稻中, *CBF1* 基因表达对脯氨酸含量的提高有明显的作用, 换句话说, *CBF1* 基因的表达促进了水稻体内脯氨酸的大量合成。这在过量表达 *CBF3* 基因的拟南芥植株中也有类似的报道^[12]。

自从 1998 年 Jaglo-Ottosen 等^[9]报道 *CBF1* 可以

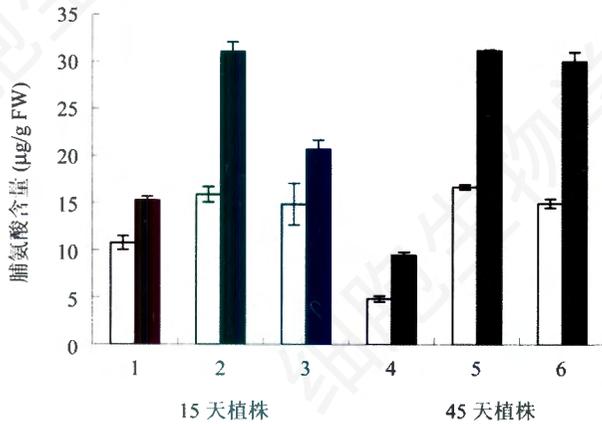


图4 常温和低温处理2天T1代2个株系及野生型植株叶片脯氨酸含量

1: 野生型15天植株; 2: T1-1的15天植株; 3: T1-2的15天植株; 4: 野生型45天植株; 5: T1-1的45天植株; 6: T1-2的45天植株。白框表示正常温度, 黑框表示低温处理。

提高植物抗冻性之后, 关于 *CBF* 提高植物抗冻性这方面的报道很多, 但一般都认为 *CBF* 是对其下游的 *COR* 基因的调控来达到提高抗冻性的目的。而 *CBF3* 过量表达引起的拟南芥低温处理前后脯氨酸含量均高于非过量表达 *CBF3* 植株表型及相对应的一个重要的脯氨酸生物合成酶 *P5CS* 基因也随之表达增加, 说明 *CBF3* 对脯氨酸含量的调控是通过其上游合成酶 *P5CS* 的调控实现的^[12]。

而在本试验中, 在 *CBF1* 转移的情况下, 低温处理前后水稻转化植株的脯氨酸含量均高于野生型的含量。由此可以推测 *CBF1* 作用于脯氨酸也很可能是通过调控 *P5CS* 基因而达到的。从而导致植株抗冻能力的提高。

从图4中也可见相同的野生型的15天苗和45天植株在处理前后的脯氨酸含量也表现出明显的差异, 即年龄大的植株体内的脯氨酸含量低, 这可能与水稻发育过程有关, 有报道认为水稻在发芽后, 需生长至三叶期(即第3片完全叶展开时), 种子胚乳中养分耗尽^[13]。而该试验中15天苗的第3片完全叶刚开始出现, 但未展开, 故推测, 幼苗体内脯氨酸含量比大龄植株高并不完全是体内合成所致,



图5 15天T1-1及野生型苗3~4℃, 12h光照, 2天低温处理后表型

估计有部分来自胚乳中有关蛋白质分解所致。

2.5 T1代苗低温处理后表型

取15天苗龄的T1代苗和野生型苗, 经过3~4℃, 12h光照, 2天低温处理后, T1-1表现出比野生型明显强的抗低温能力。由图5可知, 低温对T1-1植株造成的伤害(叶片萎缩、卷曲、黄化^[14])明显比野生型小, 即T1-1耐低温能力较野生型强。

本研究表明, 转移拟南芥 *CBF1* 基因, 能提高水稻的脯氨酸含量和耐低温能力。下一代(T2)转基因种子的收取以及进一步的深入研究正在进行之中。

参考文献 (References)

- [1] Alberdi M et al. *Phytochemistry*, 1993, 33: 57
- [2] Koster KK et al. *Plant Physiol*, 1992, 98: 108
- [3] McKown R et al. *J Exp Bot*, 1996, 47: 1919
- [4] Wanner LA et al. *Plant Physiol*, 1999, 120: 391
- [5] Chan MT et al. *Plant Mol Biol*, 1993, 22: 491
- [6] Hiei Y et al. *Plant J*, 1994, 6: 271
- [7] Azhakanandam K et al. *J Plant Physiol*, 2000, 157: 429
- [8] Gilmour SJ et al. *Plant J*, 1998, 16: 433
- [9] Jaglo-Ottosen KR et al. *Science*, 1998, 280: 104
- [10] Medina J et al. *Plant Physiol*, 1999, 119: 463
- [11] Troll W et al. *J Biol Chem*, 1955, 215: 655
- [12] Gilmour SJ et al. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1854
- [13] 王松华等. *安徽农业技术师范学院学报*, 1998, 12: 15
- [14] 钱前等. *科学通报*, 1999, 44: 22

Transfer of *Arabidopsis* *CBF1* Gene Leads to Increased Proline Contents in Rice Plants

Jian-Feng Jin, Qiang Gao, Yong Chen, Jun-Hui Wang*

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract In the present paper, using *Agrobacterium*-mediated transgene technique, an *Arabidopsis* anti-freeze transcriptional factor gene *CBF1* was successfully introduced into japonic rice Zhonghua 11, and T1 generation of transgenic rice was achieved. The *CBF1* gene and the selection gene *HPT* were detected in the T1 seedlings, and these genes were in Mendelian single-copy inheritance. Both under normal and low temperature, the proline contents in transgenic rice were increased; meanwhile, some low-temperature-tolerance phenotype was observed.

Key words *CBF1*; rice; low temperature; proline

Received: May 20, 2004 Accepted: August 31, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30400036) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.399505)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88273325, Fax: 86-571-88051629, E-mail: junhuiwang@zju.edu.cn